

Methoden und Probleme der Samenübertragung bei Haussäugetieren *)

(Aus der Tierklinik für Geburtshilfe und Fortpflanzungskrankheiten der Freien Universität Berlin, Direktor: Professor Dr. H. Tillmann.)

Von J. Huhn.

(Mit 2 Abbildungen auf Tafel VIII.)

Wenn wir uns mit der Frage der Samenübertragung bei Säugetieren befassen wollen, so sind wir gezwungen, uns lediglich auf einige wenige Haussäugetiere zu beschränken. Die Ursache dieser Beschränkung ist im wesentlichen auf den charakteristischen Entwicklungsgang zurückzuführen, den die Samenübertragung, beginnend mit Spallanzanis ersten Experimenten an Hunden im Jahre 1870, bis in die Gegenwart hinein genommen hat. Von Anfang dieser in der Endphase stürmischen, nach Spallanzani jedoch ein Jahrhundert lang fast vergessenen Entwicklung haben in erster Linie die praktischen Gesichtspunkte der Anwendung und nicht die wissenschaftlichen Fragen der Grundlagenforschung im Vordergrund gestanden. Auch die grundlegenden Erkenntnisse, die Elia Iwanow, der Vater der modernen Samenübertragung, 1912 in seiner Dissertation veröffentlichte, wurden von ihm selbst und noch mehr von den nachfolgenden Forschern sofort am nutzbringenden Haussäugetier in die Praxis umgesetzt.

Im Mittelpunkt des praktischen Interesses haben von da an die Wiederkäuer als Haustierart mit größtem wirtschaftlichen Nutzeffekt gestanden. Alle anderen Tierarten, wie Pferde, Schweine, Hunde und Kaninchen, mit denen wohl auch experimentiert wurde, traten weit in den Hintergrund; wirtschaftlich bedeutungslose Säuger blieben überhaupt außerhalb des Interessenkreises. Neben den ökonomischen Belangen sind jedoch auch technische Schwierigkeiten und entscheidende Wissenslücken der Fortpflanzungsphysiologie dieser Säugetierarten bestimmend für diese Unterlassung gewesen.

Die bezüglich der Samenübertragung günstigen physiologischen Verhältnisse der Wiederkäuer haben es gestattet, daß die künstliche Besamung bei ihnen gelang, ohne daß verschiedene grundlegende physiologische Tatsachen bekannt waren und berücksichtigt werden konnten. Glückliche Hand und exaktes Nachahmen der Vorgänge des natürlichen Paarungsaktes führten zu raschem Erfolg. Erst nach gelungener Samenübertragung setzte gewisser-

*) Vortrag in der Sitzung der Deutschen Gesellschaft für Säugetierkunde am 24. Juni 1957 in Berlin.

maßen nachträglich die Erforschung der physiologischen Zusammenhänge ein. Ohne die stürmische Entwicklung der Samenübertragung wäre der Stand unseres heutigen Wissens weit lückenhafter.

Die fördernden wirtschaftlichen Motive der Intensivierung der Samenübertragung wurden im wesentlichen von zwei Faktoren getragen:

1. dem züchterischen Interesse, und

2. dem Bestreben der Bekämpfung der übertragbaren Deckinfektionen.

Die schon in den Anfangsstadien der Besamung erkannten züchterischen Vorteile der intensivsten Ausnutzung weniger hervorragender Vatertiere mit besonders erwünschten Erbanlagen zur beschleunigten Verbesserung der Landrassen auf dem Wege der Verdrängungskreuzung und die Möglichkeit, dadurch eine rasche Verbesserung der einzelnen Leistungs- und Eigenschaftsanlagen der Hochzuchten und Landrassen zu erzielen, gaben *Milowanow* und seinen Mitarbeitern Veranlassung, bereits im Jahre 1931 nach Erforschung vieler bedeutender Fragen in Rußland ausgedehnte Besamungsversuche im praktischen Großeinsatz durchzuführen. Die Chance, mit Hilfe der Samenübertragung inzuchtimmune, erbreine, mehr oder weniger homozygote Leistungslinien zur Verbesserung der Hochzuchten schneller herauszuchten zu können, wurde von den Tierzüchtern mit großem Interesse wahrgenommen. Die Möglichkeit der Einsparung von Vatertieren minderer Qualität und die schnellere Erkennung des Erbwertes eines Samenspenders durch die in kurzer Zeit erzeugte große Anzahl von Nachkommen gaben der Entwicklung ebenfalls fördernde Impulse.

Die guten Erfolge der russischen Großversuche ließen die Tierärzte und Tierzüchter anderer Länder aufhorchen und gaben Veranlassung, das Verfahren — wenn auch unter großem Zögern — zu übernehmen. Unter den europäischen Ländern fand die Samenübertragung in größerem Ausmaß Eingang nach Dänemark. In Deutschland erhoben sich zunächst große Bedenken gegen die Übernahme der Besamung. Nur der Überzeugungskraft und der Energie eines Prof. Götze, der sich um die Entwicklung der Methode der Samenübertragung hervorragende Verdienste erworben hat, war es zu danken, daß 1942 die erste deutsche Besamungsstation in Pinneberg gegründet wurde.

Die weitere Ausdehnung der künstlichen Besamung wurde durch die dringende Forderung zur Bekämpfung der sich laufend weiter verbreitenden Deckinfektionen der Rinder in Deutschland begünstigt. Nur mit Hilfe der Samenübertragung ist es uns möglich gewesen, eine weitere Ausbreitung der Genitaltrichomoniasis zu verhindern und eine Sanierung der verseuchten Gebiete zu erreichen.

In welchem Ausmaß sich die künstliche Besamung im Laufe der vergangenen zehn Jahre durchgesetzt hat, kann an Hand weniger Zahlen demonstriert werden:

In Dänemark wurden im Jahre 1955 75 %, in England und Wales 50 %, in der Bundesrepublik 20,3 %, in den Vereinigten Staaten von Nordamerika 20 % (A D R ; 1956 a), in den deutschen Bundesländern (R a t h ; 1956) Schleswig-Holstein 43 %, im Rheinland 30 %, in Bayern 16 % und in Hessen 15 % aller Kühe künstlich besamt.

Die wichtigsten Voraussetzungen für erfolgreiche Samenübertragungen sind die Gewinnung vollständiger, qualitativ hochwertiger Ejakulate von erbgesunden, dem züchterischen Ziel entsprechenden Vatertieren, eine zweckmäßige lebenserhaltende Konservierung und Verdünnung des Spermas in der Außenwelt, der gefahrlose Transport des konservierten Samens und schließlich eine den physiologischen Verhältnissen der Samenempfängerin angepaßte Insemination.

Zur Samengewinnung haben sich im Laufe der Jahre besonders zwei Verfahren als besonders geeignet herausgestellt:

1. Die Gewinnung des Spermas mit Hilfe einer doppelrohrigen künstlichen Vagina und
2. die Elektroejakulation.

Beide Methoden erfüllen im allgemeinen die an ein brauchbares Verfahren, zu stellenden Bedingungen der Gewinnung eines vollständigen, wenig verunreinigten Ejakulates mit normaler Spermiendichte in der Kubikeinheit und guter Lebensfähigkeit der Spermien, ohne die Gesundheit und den Geschlechtstrieb des Samenspenders zu beeinträchtigen.

Prinzipiell gesehen, schaltet sich die Samenabnahme mit der künstlichen Vagina in den normalen Ablauf des Paarungsvorganges ein und macht sich hierbei die gleichen Reize nutzbar, die beim natürlichen Deckakt die Ejakulation auslösen. Zur Erreichung dieses Zieles müssen wir bestrebt sein, die von Tierart zu Tierart variierenden reizauslösenden Gegebenheiten bei der Konstruktion von künstlichen Vaginen nachzuahmen. Wir werden daher bei den einphasisch ejakulierenden, zu den Scheidenbesamern zu rechnenden Wiederkäuern nur dann eine Ejakulation erzielen können, wenn wir die Eingangsöffnung der auf Körpertemperatur erwärmten künstlichen Scheide mit einer elastischen schlitzförmigen Verengung ausstatten. Dem — wenn auch indirekt — in den Uterus ejakulierenden Hengst müssen wir eine breite Anlage- und Druckfläche für die Glans penis am Ausgang der künstlichen Scheide bieten, um bei ihm den Ejakulationsreiz auszulösen. Eine Verengung der Eingangsöffnung der künstlichen Vagina ist überflüssig und störend. Dem mehrphasisch intrauterin absamenden Eber müssen eine ringförmige Verengung des Vaginaleinganges und eine spaltförmige, den Zervikalpolstern der Sau entsprechende Verengung der Ausgangsöffnung der künstlichen Vagina präsentiert werden. Für die mehrphasisch und unter langanhaltenden Friktionsbewegungen ejakulierenden

Schweine und Hunde empfiehlt es sich, einen Luft-Pulsator zur Nachahmung der während des natürlichen Deckaktes ablaufenden Scheidenkontraktionen in die künstliche Vagina einzubauen.

Die Samenentnahme selbst wird beim Aufsprung des Samenspenders auf eine brünstige oder auch nicht brünstige Artgenossin oder beim Aufsprung auf ein geeignetes Phantom durchgeführt. Bullen und Ziegenböcke mit guter Geschlechtslust bespringen auch ohne Zögern gleichgeschlechtliche Artgenossen. Beim Aufsprung wird der eregierte Penis des Samenspenders während der ausgeführten Suchbewegungen ohne Störungen des Deckaktes seitlich abgelenkt und in die Eingangsöffnung der künstlichen Vagina hineindirigiert. Eine gute Fixierung und korrekte Schräghaltung der künstlichen Vagina erlaubt dem Samenspender die Ausübung des Nachstoßes bzw. der Friktionsbewegungen.

Besondere Beachtung muß bei der Samengewinnung der Vermeidung unnötiger Verunreinigung des Spermas durch Schmutz und durch Keime geschenkt werden, die in der Lage sind, die Konservierungs- und Besamungsergebnisse sehr wesentlich zu beeinträchtigen. Weiterhin ist zu berücksichtigen, daß die außerordentlich spermaschädlichen, während der Vorbereitung des Samenspenders zum Aufsprung abträufelnden Vorsekrete der Harnröhren- und Bulbourethraldrüsen bei der Samenentnahme nicht mit aufgefangen werden.

Zur Samengewinnung bei den mehrphasisch, 10—20 Minuten lang ejakulierenden Ebern und Hunden empfiehlt es sich, nicht wie bei den Wiederkäuern eine künstliche Vagina mit abgeschlossenem Ejakulationsraum, sondern eine solche mit offenem Ejakulationsraum zu verwenden, um während der Ejakulation die ausfließenden ersten und dritten spermienarmen Fraktionen von dem mittleren spermienreichen Teil trennen zu können.

Bezüglich der Vorbereitung der künstlichen Vagina zur Samenentnahme sei lediglich hervorgehoben, daß es sehr darauf ankommt, die Temperatur des Ejakulationsraumes durch eine entsprechende Wasserfüllung des Wärmerraumes der künstlichen Vagina genau der Körpertemperatur des Samenspenders anzupassen. Schon geringgradige Variationen der Temperatur der künstlichen Vagina lassen die Ejakulation ausbleiben.

Bei der Elektroejakulation können wir auf die Gegenwart eines Entsamungswelbchens verzichten. Mit Hilfe von zwei Elektroden, von denen eine rektal bis in die Region des letzten Lendenwirbels eingeführt und die andere an der äußeren Haut in der gleichen Region befestigt wird, kann das im Lendenmark gelegene Ejakulationszentrum mit einem Wechselstrom von 50 Perioden pro Sekunde bei einer Spannung von 30 Volt mit einer Stromstärke von 140—170 Milliampère ejakulationsauslösend gereizt werden (Rowson und Murdoch, 1954; Lüps, 1955). Im allgemeinen genügen 2—5 Reizungen von 5—10 Sekunden. Um bessere Leitungsverhältnisse zu

erzielen, ist der Enddarm zu entleeren und mit einprozentiger Kochsalzlösung anzufüllen. Bei gleichzeitiger elektrischer Reizung des etwas weiter caudal im Kreuzmark gelegenen Erektionszentrums kann zumindest eine partielle Erektion und das vorherige Abfließen der Vorsekrete erreicht werden, was für die Gewinnung eines einwandfreien Ejakulates von großer Bedeutung ist. Wenn die Teilerektion ausbleibt, fließt das aufzufangende Sperma durch den Präputialraum, wird stark verunreinigt und für längere Konservierung unbrauchbar.

In der Haustierbesamung hat dieses Verfahren bisher lediglich in Australien Bedeutung für die Samengewinnung beim Schafbock erlangen können. Es steht jedoch fest, daß diese Methode von großem Wert für die Samengewinnung von kleinen Versuchstieren und von wildlebenden Säugetieren zu fortpflanzungsphysiologischen Untersuchungen sein kann.

Praktisch und wirtschaftlich wertvoll wird die Samenübertragung erst dann, wenn es gelingt, das Sperma in der Außenwelt bei voller Erhaltung seiner Befruchtungs- und Lebenskraft zu verdünnen, zu konservieren und zu transportieren. Alle Manipulationen mit dem Sperma müssen so vorgenommen werden, daß schädliche Einflüsse der Außenwelt, wie ungünstige Temperatureinwirkungen, Veränderungen des osmotischen Gleichgewichtes, die Beimischung von schädigenden Elektrolyten und Keimen sowie übermäßige Einwirkung von Licht- und anderen Strahlungen ausgeschaltet oder zumindest weitgehend eingeschränkt werden (Götze, 1949).

Gegenüber Temperatureinwirkungen ist das Sperma sehr empfindlich. Erwärmung über die Höhe der Körpertemperatur hinaus hat rasche Abtötung und Denaturierung der Spermien zur Folge. Eine Abkühlung hingegen wird, wenn sie unter Beachtung gewisser Vorsichtsmaßnahmen erfolgt, recht gut vertragen. Diese Eigenart der Anpassung des Spermas an herabgesetzte Temperaturen ist die hauptsächlichliche Grundlage der Samenkonservierung. Ein rascher Abfall der Temperatur des Ejakulates von Körperwärme bis zu einer Temperatur von $+ 20^{\circ} \text{C}$ wird mehr oder weniger ohne jede Schädigung der Spermien vertragen. Dieses Phänomen machen wir uns bei der Samenentnahme zunutze, indem wir das gewonnene Ejakulat sofort in ein bei 20°C im Wasserbad stehendes Aufnahmegefäß bringen. Eine weitere Abkühlung bleibt nur dann ohne nachteilige Einwirkungen, wenn wir die Temperatur gleichmäßig langsam, nicht schneller als 1°C innerhalb von 5 bis 10 Minuten herabsetzen. Bei $+ 18^{\circ} \text{C}$ macht sich ein kritischer Temperaturpunkt des Spermas bemerkbar. Ubereilte Kühlung oder schlagartige Temperaturherabsetzungen haben an diesem kritischen Temperaturpunkt schockähnliche Schädigung der Spermien zur Folge. Diese Tatsache gibt uns Veranlassung, die Samenentnahme deshalb zur sicheren Vermeidung einer solchen Schockwirkung nur in einem gut temperierten Raum von $+ 20^{\circ} \text{C}$ vorzunehmen. Die Eingefrierung des Samens ohne beson-

dere Zusätze, auf die wir später noch eingehen werden, tötet den größten Teil der Spermien ab.

Osmotische Schädigungen werden vorwiegend durch die Zufügung von hyper- oder hypotonischen Flüssigkeiten oder von ungeeigneten Elektrolyten hervorgerufen. Im Spermabild machen sich bei der mikroskopischen Untersuchung die durch nicht zusagenden osmotischen Druck bewirkten Veränderungen durch sichel-, peitschen- oder notenschlüsselförmige Verkrümmungen des Spermischwanzes und durch pathologische Kreis- oder Rückwärtsbewegungen der Spermien bemerkbar.

Die kolloidalen Schutzhüllen der Spermien besitzen bei den einzelnen Säugetierarten eine unterschiedliche Festigkeit gegenüber Elektrolyten. Bullenspermien vertragen einen höheren Elektrolytgehalt als Schafspermien. So gibt Milowanow z. B. das optimale Verhältnis von Elektrolyten zu Nichtelektrolyten für Rindersperma mit 4:1 und für Schafsperma mit 1:9 an (Götze, 1949). Zu reichlicher Elektrolytgehalt einer zugefügten Flüssigkeit bewirkt außer Verringerung der Lebensdauer der Spermien auch infolge Veränderungen der gleichartigen negativen elektrischen Ladung der Wiederkäuerspermien Agglutination. Sulfat-, Tartrat-, Phosphat- und besonders Citratanionen scheinen für die Erhaltung der Schutzhülle der Spermien besonders geeignet zu sein. Sie werden deshalb zur Herstellung von Verdünnungsflüssigkeiten den Chloriden, Chloraten und Nitraten vorgezogen.

Bemerkenswert ist, daß zu den nachteilig einwirkenden Anionen auch die Chloride gehören, die in den sich dem Ejakulat beimengenden akzessorischen Sekreten der Säugetiere mit Gebärmutterbesamung so reichlich vorhanden sind. Hierdurch lassen sich zumindest teilweise die schlechten Konservierungsergebnisse der Ejakulate dieser Tierarten erklären.

Markante Zusammenhänge bestehen auch zwischen der Wasserstoffionenkonzentration und der Eignung eines Ejakulates zur Konservierung. Die günstigsten Verhältnisse liegen wiederum im Wiederkäuer-ejakulat vor, einem Ejakulat mit einem geringen Anteil von akzessorischen Sekreten. Ganz allgemein kann festgestellt werden, daß die Konservierungsaussichten dann am günstigsten sind, wenn pH-Werte im leicht sauren Bereich von 6,7 bis 6,9 vorliegen. Außerhalb des Organismus sinkt der pH-Wert des aufbewahrten Spermias in der Regel nach der sauren Seite ab. Diese Erscheinung ist eine Folge der Glykolyse und der damit verbundenen Bildung von Milchsäure. Die Änderung des pH-Wertes kann daher bis zu einem gewissen Grad einerseits als Maßstab für die Aktivität des Stoffwechsels der Spermien, andererseits aber auch als Gradmesser der Pufferungsfähigkeit des Spermaplasmas für entstandene schädliche Stoffwechselprodukte, wie Milchsäure, angesehen werden. Je langsamer der pH-Wert also im aufbewahrten Ejakulat absinkt, um so besser sind Pufferung und damit Konservierungsaussichten.

Eine geeignete, die Lebensfähigkeit des unverdünnten Spermas bei der Aufbewahrung verlängernde Verdünnungsflüssigkeit muß den angeführten Gegebenheiten angepaßt sein. Neben einem günstigen pH-Wert, der sich für Wiederkäuersperma zwischen 6,8 und 6,9 zu bewegen hat, muß ein brauchbarer Verdünner ein gutes Pufferungsvermögen als Gegenwirkung gegen die spontane Säuerung durch die entstehende Milchsäure aufweisen.

Die, wie bereits erwähnt, von Tierart zu Tierart variierenden chemischen Zusammensetzungen bedingen die Verwendung von unterschiedlich zusammengesetzten Verdünnungsflüssigkeiten. Für Pferd und Schwein müssen diese Lösungen einen pH-Wert von 7,0 bis 7,4 besitzen. Im Zuge der bisherigen Untersuchungen ist es noch nicht gelungen, für das Sperma dieser Tierarten befriedigende Verdüner herzustellen.

Selbst bei gewissenhaftester Durchführung der Samementnahme ist es nicht zu vermeiden, daß eine beachtliche Keimmenge (meist mehr als 10.000 Keime pro ccm) mit in das Ejakulat gelangt. Die schädigende Wirkung der Keime beruht nicht nur auf ihren toxischen Stoffwechselprodukten, sondern auch auf der chemisch-physikalischen Veränderung des Spermaplasmas. So führen auch bakteriell hervorgerufene Verschiebungen des pH-Wertes und des osmotischen Druckes sehr bald zum Tod der Samenzellen. Die uns zur Verfügung stehenden Mittel, diese mikrobiellen Schädwirkungen einzudämmen, bestehen in der Herabsetzung der Aufbewahrungstemperatur des Samens, wobei die Vermehrungsbedingungen der meisten Keime beeinträchtigt werden, und im Zusatz von wirksamen keimhemmenden Substanzen.

Zur Verdünnung und Konservierung sind nur qualitativ hochwertige Ejakulate geeignet, die bei der Untersuchung unmittelbar nach der Samementnahme bezüglich der Ejakulatsmenge, der Spermiedichte, der Spermienresistenz und der Beweglichkeit der Spermatozoen gute Ergebnisse aufweisen.

Die Verdünnung dient nicht nur dem Zweck, das Volumen des gewonnenen Ejakulates zu vergrößern, um es besser teilbar zu machen und um eine größere Anzahl von Empfängerinnen besamen zu können, sondern sie soll, wie bereits betont wurde, in erster Linie dazu beitragen, die Lebens- und Befruchtungsfähigkeit des Spermas *in vitro* so lange wie möglich zu erhalten.

Die Möglichkeiten der Konservierung und Verdünnung, die eng miteinander verknüpft sind, werden von der Art der Stoffwechselforgänge der Säugetierspermien bestimmt. Ihr Stoffwechsel ist gemäß ihrer biologischen Aufgabe weniger auf die Assimilation von Nährstoffen gerichtet, sondern beschränkt sich mehr auf den Verbrauch des geringen vorhandenen Nährmaterials und dessen Umsetzung in Energie und Bewegung. Als hauptsächlichste Energiequelle für die anaerobe Glykolyse kommen die im Spermaplasma enthaltenen Zuckerarten Glukose und Fruktose in Betracht.

In der Gegenwart von Sauerstoff sind die Spermien jedoch auch in der Lage, Energie durch Atmung, d. h. durch Verbrennung von zelleigenen Vorräten wie Eiweißkörpern und Lipoiden, zu erzeugen. Die Atmung und ebenso die Glykolyse ermöglichen den Spermien weder im Reagenzglas noch im weiblichen Genitalapparat eine längere Lebensdauer. Die unter dem Einfluß von Sauerstoff stehenden Spermien ermüden unter Verbrauch ihrer geringen Energievorräte an Eiweiß und Lipoiden sehr schnell. Die gleichzeitig ablaufende Glykolyse führt zur Entstehung der schädlichen Milchsäure, die schließlich den Tod der Spermien herbeiführt. Obwohl in Anwesenheit von Sauerstoff ein Teil der entstandenen Milchsäure wieder in Glukose zurückverwandelt werden kann, sammelt sich doch im Medium immer mehr schädliche Milchsäure an, weil die durch den Sauerstoff angeregten heftigen Bewegungen der Spermien ihrerseits die Glykolyse steigern. Dieser *Circulus vitiosus* kann nur durch weitgehende Herabsetzung des Stoffwechsels unter gleichzeitiger Zuführung von nährender Glukose und puffernder Verdünnungsflüssigkeit unterbrochen werden.

Die Herabsetzung der Aufbewahrungstemperatur des Spermas versetzt die Spermien in eine Kälteanabiose, die in ihrer Intensität proportional der Kühltemperatur ist. Bei allmählicher Temperaturniedrigung auf Grade zwischen $+1$ und $+4^{\circ}\text{C}$, wie es bei der bisher am weitesten verbreiteten einfachen Kühlkonservierung der Fall ist, sind wir unter Zufügung zusagender Verdünnungsflüssigkeiten in der Lage, die Lebens- und Befruchtungsfähigkeit des Wiederkäuerspermas 3 bis 7 Tage gut zu erhalten. Bei Anwendung des 1952 von den Engländern Polge und Rowson entwickelten Tiefgefrierverfahrens, mit dem wir uns später noch befassen wollen, bei dem die Aufbewahrungstemperatur auf -79°C herabgesetzt wird, kann das Sperma der Wiederkäufer über Jahre voll befruchtungsfähig konserviert werden.

Von der Vielzahl der erprobten Verdünnungsflüssigkeiten hat sich der Citratverdünner am besten für das Rindersperma bewährt. Verschiedene Zusätze wie Eidotter, Glycin, Gelatine, Sulfonamide und Antibiotika verbessern den 3,6—4,5 prozentigen Natriumcitratverdünner sehr wesentlich. Die Beimengung von 10 bis 30 % frischen Hühnereidotter als kolloidales Schutzmittel hat sich außerordentlich günstig ausgewirkt. Ob den im Eidotter enthaltenen Phosphorlipoiden, dem Lecithin und dem Cephalin, noch eine andere vorteilhafte Einwirkung zukommt, ist zur Zeit noch unbekannt (Kampschmidt u. Mitarb., 1953). Von Bedeutung ist, daß mit frischem Eidotter versetzter Verdünner so rasch wie möglich verbraucht werden muß und daß unterschiedliche Konservierungs- und Befruchtungsergebnisse erzielt werden, wenn Eidotter verschiedener Hühnerrassen verwendet werden. Am geeignetsten haben sich die Dotter der schweren New Hampshire- und Sussex-Hühnerrassen erwiesen (Aehnelt und Brockmann (1955).

Die Zufügung von 2 bis 5 % elektrolytfreier Gelatine als Schutzkolloid und zur Vermeidung des Sedimentierens der Spermien in der bei Kühlung gelierenden Spermien suspension hat sich bewährt. In den Vereinigten Staaten wird neuerdings die Beimengung der Aminosäure Glycin empfohlen, die, wie durch radioaktive Markierung nachgewiesen werden konnte, von den Spermien auch aufgenommen wird (Roy und Bishop, 1954; Flipse und Almquist, 1955).

Schließlich bezweckt der Zusatz von Sulfonamiden und Antibiotika eine bemerkenswerte Keimhemmung im verdünnten Ejakulat. Durch die kombinierte Beifügung von 50 gamma der Sulfonamide Sulfanilamid oder Polymyxin B-Sulfat, 250 I. E. Penicillin und 250 gamma Streptomycin pro ccm Verdünnungsflüssigkeit wird der Spermabegleitflora ein breites, als Antibiotikaschere bezeichnetes Wirkungsspektrum entgegengestellt (Baier und Mitarb., 1955; Bonfert, 1956; Ullner, 1957). Höhere Konzentrationen und Zugabe von Aureomycin wirken sich schädigend auf die Spermien aus.

Es soll nicht unerwähnt bleiben, daß in den Vereinigten Staaten in der Rinderbesamung beste Erfahrungen mit Eidotter-Milchverdünnern gemacht wurden. Mit diesem Verdünnern, der aus frischer, entrahmter und nachher aufgekochter Kuhmilch unter Zusatz von 10 % Eidotter und Antibiotika hergestellt wird, konnten gleich gute Konservierungs- und Befruchtungsergebnisse wie mit Eidotter-Citrat-Verdünnern erzielt werden (Weiss, 1952; Peters, 1953).

Die Frage, wie hoch das Verdünnungsverhältnis sein darf, kann nicht allgemeingültig beantwortet werden. Jeder Verdünnern hat sein eigenes optimales Verdünnungsverhältnis. Deutsche Untersuchungen haben gezeigt, daß die bei uns gebrauchten Verdünnern in der Mehrzahl die sichersten Konservierungs- und Besamungsergebnisse bei einer Einhaltung des Verhältnisses von 1:5 bis 1:10 ergeben. Amerikanische Autoren hingegen berichten von gleich guten Besamungserfolgen mit Verdünnungen von 1:100 bis 1:400 (Salisbury und Bratton, 1948). Obwohl die enorme Spermiedichte der Ejakulate des Bullen, die zwischen 1 und 2 Millionen pro cmm liegt, durchaus sehr hohe Verdünnungsspannen zuläßt, erscheint es uns zu riskant, nach derartigen Extremen zu streben, auch wenn man berücksichtigt, daß selbst in diesen hohen Verdünnungen noch die Mindestzahl von 5 Millionen Spermien pro Besamungsdosis enthalten ist.

Verschiedene Autoren haben sich mit der Frage befaßt, zu welchem Zeitpunkt die Verdünnung am zweckmäßigsten vorzunehmen ist, vor oder nach der Abkühlung. Ubereinstimmend wurde ermittelt, daß eine Verdünnung vor der Abkühlung die Befruchtungsfähigkeit der Samenzellen besser erhält. Voraussetzung zu einer schadlosen Verdünnung ist die absolut gleiche Temperierung des Spermas und des Verdünners und das langsame

schubweise Zugeben der Verdünnungsflüssigkeit, um den sogenannten Verdünnungsschock weitgehend zu vermeiden.

Die vorübergehende Beeinträchtigung der Befruchtungskraft des Spermas innerhalb der ersten 12 bis 24 Stunden nach Zugabe des Verdünnungsmittels muß als Symptom der Anpassung der Spermien an das neue Medium gedeutet werden.

Alle Versuche, mit prinzipiell gleichen Methoden eine längere Konservierung der Ejakulate der mehrphasisch ejakulierenden Tierarten wie Pferd, Hund und Schwein zu erzielen, sind bisher mehr oder weniger fehlgeschlagen. Die Ursachen hierfür liegen im wesentlichen, wie bereits erwähnt, in den ungünstigen Voraussetzungen, die durch den großen Anteil der völlig anders zusammengesetzten akzessorischen Sekrete gegeben sind. Durch Rowsons Experimente an Schweinen (1956) wurde wenigstens ein kleiner anfänglicher Schritt vorwärts getan. Ihm gelang sowohl mit Magermilchverdünner als auch mit einer 2prozentigen Glycinlösung mit einem Zusatz von 30% Eidotter die 24stündige Konservierung befruchtungsfähigen Spermas.

Wenn in der Konservierung der Ejakulate dieser Tierarten ein Fortschritt erzielt werden soll, so wird dies wahrscheinlich nur durch die völlige Abtrennung der Spermien von den akzessorischen Sekreten durch vorsichtiges Zentrifugieren und durch Überführung der isolierten Spermien in ein anderes geeignetes Medium möglich sein.

Unter Verwendung von zweckmäßigen Kühlbehältern stellt der Transport des auf $+4^{\circ}\text{C}$ gekühlten Wiederkäuerspermas keine Schwierigkeit dar. Bei genügender Eisfüllung, guter Isolierung, Bruchfestigkeit des Isoliergefäßes und festem Verschluss des Transportbehälters und der Samenröhrchen ist selbst ein 24 Stunden dauernder Bahnversand von Samen ohne Beeinträchtigung der Spermaqualität möglich. Nur unter Einsatz des Samentransportes sind wir überhaupt in der Lage, die wirtschaftlichen und züchterischen Vorteile der Samenübertragung voll auszunutzen.

Das der Samenkonservierung ursprünglich gesteckte und kaum für erreichbar gehaltene Ziel der Aufrechterhaltung der Lebens- und Befruchtungsfähigkeit des Spermas über Zeitspannen, wie wir sie im Nebenhodendkanal beobachten können, ist mit der Einführung der Samentiefgefrierung inzwischen weit übertroffen worden. Die 1938 aufsehenerregende Entdeckung des Deutschen Jähnel, daß menschliches Sperma lange Zeit das Einfrieren mit Kohensäureeis bei -78°C , mit flüssigem Stickstoff bei -196°C und mit flüssigem Helium bei -269°C überlebte, regte Jahre später englische Forscher (Polge u. Mitarb., 1949; Polge, 1951; Polge und Lovelock, 1952) zu systematischen Untersuchungen am Wiederkäuersperma an, die 1952 Polge und Rowson zur Veröffentlichung eines brauchbaren Gefrierverfahrens führten. Auf Grund der Möglichkeit der jahrelangen Konservierung befruchtungsfähigen Samens, des unbeschränkten

Versandes und der damit verbundenen züchterischen und wirtschaftlichen Nutzenanwendungen hat die Tiefgefrierung sehr rasch Eingang in viele Länder, darunter auch Deutschland, gefunden.

Zur Erläuterung des Gefrierverfahrens seien die Empfehlungen von Eibl und seinen Mitarbeitern (1954 und 1955) im folgenden zusammengefaßt:

Das Sperma von bester Qualität wird zunächst wie üblich im Wasserbad von $+25^{\circ}\text{C}$ im Verhältnis 1:10 mit Citratpuffer verdünnt. Nach Abkühlung des verdünnten Spermas auf $+5^{\circ}\text{C}$ verbleibt dasselbe zunächst bei dieser Temperatur zur Erzielung einer Anpassung der Spermien an das neue Medium für 5 Stunden im Kühlschrank. Nun erfolgt bei gleicher Temperatur der Zusatz von 15—20 prozentigem Glycerincitrat zur Sperma-Citratverdünnung im Mengenverhältnis von 1:1. Besonders zu beachten ist, daß die Zugabe des Glycerincitrates in fünf gleich großen Fraktionen erfolgt. Jede dieser 5 Fraktionen muß in einem Mindestzeitraum von 10 Minuten vorsichtig und langsam zugefügt werden. Diese Verfahrensweise erscheint sehr umständlich, das strikte Einhalten dieser Vorschrift ist jedoch unumgänglich, wenn gute Konservierungsergebnisse erzielt werden sollen. Die Endverdünnung des Spermas beträgt also 1:20, die Endkonzentration des Glycerins 7,5—10 %.

Zur erneuten Gewöhnung an das veränderte Medium und zur Dehydratisierung der Spermien verbleibt das Samen-Puffer-Gemisch bei einer Temperatur von $+5^{\circ}\text{C}$ bis zur Abfüllung in Einzelbesamungsdosen und bis zur Gefrierung für weitere 12—20 Stunden im Kühlschrank.

Die Gefrierung erfolgt in zwei Phasen. Zunächst wird unter Zugabe von CO_2 -Eiswürfeln zu einer Alkoholsole die Temperatur von $+5^{\circ}\text{C}$ unter Einhaltung der Abkühlgeschwindigkeit von $\frac{1}{2}^{\circ}\text{C}$ pro Minute bei genauer Temperaturkontrolle auf -12°C herabgesetzt. Von da an kann durch rasches Zugeben großer Mengen von CO_2 -Eis die Temperatur mehr oder weniger schlagartig auf -78°C herabgesetzt werden. Auch die korrekte Einhaltung dieser Vorschrift ist entscheidend für den Konservierungserfolg.

Der Transport des über Jahre befruchtungsfähig konservierbaren Gefriersamens wird in einfachen, weithalsigen Thermosbehältern mit einer Trichloräthylen- CO_2 -Eis-Sole bei einer Temperatur von -78°C vorgenommen.

Vor der Insemination wird der Samen schlagartig in einem Wasserbad von $+38$ bis 40°C aufgetaut und sofort in die weiblichen Genitalorgane eingebracht.

Die bisher vorhandenen dürftigen Kenntnisse über die Kältebiologie gestatten es uns noch nicht, eine eindeutige Antwort auf die Frage nach der Wirkungsweise des empirisch herausgefundenen Glycerinzusatzes zu geben. Es steht lediglich fest, daß nach Glycerineinwirkung infolge der

hochgradigen Veränderung des osmotischen Druckes eine partielle Entwässerung des Spermienprotoplasmas unter gleichzeitigem Eintritt des Glycerins in die Samenzelle erfolgt. Die eintretende Entwässerung allein dürfte aber keinesfalls ausreichen, um die die Protoplasmastrukturen zerstörende Kristallisation des sogenannten „freien Wassers“ zu verhindern.

De Groot (1956) hat die Vorstellung, daß durch Glycerin die ungeordneten bipolaren Moleküle des „freien Wassers“ überführt werden in sogenanntes „gerichtetes Wasser“, dessen gerichtete bipolare Moleküle in kolloidalen Lösungen eine Molekülstruktur besitzen, die charakteristisch für das Eiskristall ist. Wenn das „gerichtete Wasser“ gefriert, bleibt die Lage der Moleküle unverändert; das Wasser bleibt in situ, erhebliche Raumverschiebungen wie bei der Gefrierung des „freien Wassers“, die die Strukturen des Protoplasmas mechanisch zertrümmern, treten nicht auf. Durch das Eindringen von homogen verteilten Glycerinmolekülen in die ursprünglich mit „freiem Wasser“ angefüllten Räume des Protoplasmas soll die verbleibende Menge des „freien Wassers“ in viele kleine Höfchen verteilt werden. Nach dieser Vorstellungsweise wird also ein großer Kristall ersetzt von vielen kleineren, weniger schädlichen Kristallen.

Der nächste Schritt der Verbesserung und Vereinfachung der Langzeitkonservierung wird in nicht allzu ferner Zeit zur Ultrarapidgefrierung mit flüssiger Luft und auch zur Trockengefrierung des Spermias führen.

Die Einführung der Samentiefgefrierung ist nicht ohne Widerspruch von Seiten der Genetiker geblieben. Ihre kritischen Argumente gegen die Herabsetzung der Kühltemperatur auf -78°C und gegen die Glycerineinwirkung sind im wesentlichen von der Befürchtung einer nachteiligen Beeinflussung der Erbmasse getragen. Wenn auch bisher die in mehr als einer Million Fällen durchgeführten Übertragungen tiefgefrorenen, gut befruchtenden Spermias noch keine Anzeichen für das Eintreten von negativen Genmutationen erbracht haben, so können diese Einwände zur Zeit nicht ohne weiteres zurückgewiesen werden. Zur endgültigen Entscheidung über diese Frage muß eine größere Anzahl von Generationsfolgen zur Überprüfung gelangen.

Die Übertragung eines jeden konservierten Samens in die Samenempfängerin muß unter absoluter Berücksichtigung der physiologischen Abläufe beim natürlichen Paarungsakt geschehen. Dies trifft besonders sowohl für die Wahl des Inseminationszeitpunktes als auch für den Ort der Deponierung des Spermias zu. Für die Einführung des Samens in die weiblichen Genitalorgane werden je nach Tierart verschieden geformte Glas- oder Kunststoffpipetten gebraucht. Bei den Wiederkäuern erfolgt die Einspritzung der 0,5 bzw. 1 ccm betragenden Samendosis im letzten Zeitdrittel der ca. 30 Stunden andauernden äußeren Brunsterscheinungen in den Cervikalkanal. Für Pferd, Hund und Schwein liegt der Besamungszeitpunkt in-

mittelbarer Nähe der Ovulationstermine am Übergang vom 2. zum 3. Zeitdrittel der äußeren Brunsterscheinungen. Die Deponierung der für Pferd und Schwein großen Spermadosen von 50 bis 100 ccm hat intrauterin zu erfolgen.

Die breit streuenden Besamungsergebnisse liegen bei Pferd, Schwein und Hund im allgemeinen mit weniger als 50 % Erfolgen unter dem Befruchtungshundertsatz der natürlichen Paarung. Bei den Wiederkäuern übersteigen die zwischen 85 und 99 % schwankenden Befruchtungshundertsätze der Samenübertragung die der natürlichen Paarung und haben sehr wesentlich zur raschen Ausbreitung der Samenübertragung und zur Beseitigung der anfangs gegen dieses Verfahren gerichteten Bedenken beigetragen.

Abschließend noch einige Bemerkungen zu den Gefahren, die die Samenübertragung mit sich bringen kann. Die bisher aufgetretenen Gefahrenmomente haben überwiegend züchterische Interessen berührt. So sehr die strenge Auswahl weniger hervorragender Vatertiere als Samenspendern auch geeignet sein mag, die ererbten Gesundheits-, Leistungs- und Eigenschaftsmerkmale in der Landeszucht rasch zu verbessern, so bedenklich ist doch auch die Einengung der Zucht auf wenige weit verbreitete Blutlinien.

Parallel mit dieser Blut- und Genverengung geht eine Schrumpfung der Basis der Vatertieraufzucht und der Vatertierauswahl. Infolge des Ankaufes von nur wenigen sehr guten Samenspendern durch die Besamungsstationen und der Zurückweisung der Mehrzahl der auf Auktionen angebotenen Vatertiere ist dem Züchter der Anreiz zur Aufzucht von Bullen genommen worden.

Welches Ausmaß der Nachzuchtausfall von Jungbullen durch den intensiven Einsatz von wenigen Bullen in der Samenübertragung annehmen kann, geht am eindeutigsten aus einem Beispiel aus Dänemark hervor: Hier verringerte sich in den Jahren von 1939 bis 1950 der Bullenbestand von 69 000 auf nur 36 000 Tiere um 48 % (A D R, 1951), und von diesen verbleibenden 36 000 Bullen befinden sich nur ca. 1000 Tiere auf Besamungsstationen, die annähernd 75 % des gesamten Kuhbestandes Dänemarks besamen. In den anderen Ländern mit ebenfalls hoch entwickelter Besamung ist die Situation ähnlich. Besonders deutlich tritt dieses Mißverhältnis in den Vordergrund, wenn man die Gesamtzahl der Besamungsbullen mit der Gesamtzahl der besamten Kühe vergleicht: In der Bundesrepublik wurden 1955 1 266 717 Kühe mit dem Sperma von nicht mehr als 991 Bullen besamt (A D R, 1950 b)! Anders ausgedrückt bedeutet dies, daß auf einen Bullen im Durchschnitt 1278 Kühe pro Jahr zur Besamung entfallen.

Den Gefahren einer verheerenden Ausbreitung von unerwünschten Erbanlagen durch die Samenübertragung kann nur mit einer streng gehandhabten erbbiologischen Überprüfung der Besamungsbullen und einer gewissenhaften Prüfung und Kontrolle der Nachzucht durch eine straffe Organisation begegnet werden.

Wenn auch nachteilige Beeinflussungen der Fortpflanzungsvorgänge durch die teilweise Ausschaltung der natürlichen Paarungsabläufe und damit zusammenhängender physiologischer Ereignisse bisher nicht beobachtet wurden, so müssen wir doch stets ein waches Auge auf diese Dinge richten. In dieser Hinsicht ist die Samenübertragung auch heute noch ein großes Experiment.

Zusammenfassung.

Es wird eine kurze Übersicht der Entwicklung und Häufigkeit der Anwendung der Samenübertragung beim Rind in Deutschland und in anderen Ländern gegeben. Neben den wichtigsten Fragen der Samengewinnung von einigen Haussäugetieren mit Hilfe der künstlichen Vagina und durch Elektro-Ejakulation werden die Einflüsse besprochen, denen das Ejakulat in der Außenwelt unterliegt. Im Zusammenhang mit dem Stoffwechsel der Spermien wird auf die Verdünnung, die Wirkung der Verdünnungsflüssigkeiten auf das Säugetiersperma und auf die Konservierung des Spermas eingegangen. Hierbei werden auch die Methode, Theorie und Problematik der Samentiefgefrierung angeschnitten. Abschließend werden die Befruchtungsergebnisse den züchterischen Gefahren gegenübergestellt, die eine intensive Ausbreitung der Samenübertragung mit sich bringen kann.

Summary.

A brief survey is given of the development and the frequency of artificial insemination with cattle in Germany and other countries. Besides the most essential questions of artificial insemination with some domestic mammals with the help of the artificial vagina and through electro-ejaculation, forces are discussed which effect the sperm *in vitro*. In connection with the metabolism of the sperms, details are given concerning the dilution, the effect of the dilutus on sperm of mammals, and of the preservation of the sperm. In this connection the method, theory, and problems of sperm-deep-freezing are touched. Finally, the results of insemination are contrasted with the dangers of animal breeding, which may arise from a widespread use of artificial insemination.

Literatur.

- Anonym (1951): Mitteilung der ADR (Arbeitsgemeinschaft Deutscher Rinderzüchter). Fortpflanzung und Besamung der Haustiere 1, 24.
- Anonym (1956 a): Mitteilung der ADR („Export und Transport von Bullensamen“). Fortpflanzung, Zuchthygiene und Haustierbesamung 6, 116.
- Anonym (1956 b): Mitteilung der ADR. Fortpflanzung, Zuchthygiene und Haustierbesamung 6, 84.
- Aehnel, E. u. P. Brockmann (1955): Fortpflanzung, Zuchthygiene und Haustierbesamung 5, 69.

- Baier, W., Leidl, W., Mahrla, A. u. M. Schrödl (1955): Fortpflanzung, Zuchthygiene und Haustierbesamung 5, 1.
- Bonfert, A. (1956): Fortpflanzung, Zuchthygiene und Haustierbesamung 6, 41.
- Eibl, K., Urbaschek, B. u. H. F. Zoder (1954): Fortpflanzung, Zuchthygiene und Haustierbesamung 4, 97 u. 109.
- Eibl, K. u. H. F. Zoder (1955): Fortpflanzung, Zuchthygiene und Haustierbesamung 5, 88.
- Flipse, R. J. u. J. O. Almquist (1955): *J. Animal Science* 14, 1182.
- Götze, R. (1949): Besamung und Unfruchtbarkeit der Haussäugetiere. 1. Auflage. M. & H. Schaper, Hannover.
- De Groot, B. (1956): Fortpflanzung, Zuchthygiene und Haustierbesamung 6, 25.
- Jahnel (1938): *Klin. Wschr.* 17, 1273.
- Kampschmidt, R. F., Mayer, D. T. u. H. A. Herman (1953): *J. Dairy Sci.* 36, 733.
- Lüps, P. (1955): Fortpflanzung, Zuchthygiene und Haustierbesamung 5, 52.
- Peters, J. (1953): Fortpflanzung und Besamung der Haustiere 3, 14 u. 17.
- Polge, C. (1951): *Nature* 167, 949.
- Polge, C., Smith, A. O. u. A. S. Parkes (1949): *Nature* 164, 666.
- Polge, C. u. L. E. A. Rowson (1952): The II. International Congress of Physiol. and Pathol. of Animal Reproduction and of Artificial Insemination III, 90.
- Polge, C. u. J. E. Lovelock (1952): *Vet. Rec.* 396.
- Rath, G. (1956): Fortpflanzung, Zuchthygiene und Haustierbesamung 6, 79.
- Rowson, L. E. (1956): *Agriculture*, London, No. 12, 571.
- Rowson, L. E. u. M. J. Murdoch (1954): *Vet. Rec.* 66, 326.
- Roy, A. u. W. H. Bishop (1954): *Nature* 174, 746.
- Salisbury, G. W. u. R. W. Bratton (1948): *J. Dairy Sci.*, 817.
- Ullner, W. (1957): Zuchthygiene, Fortpflanzungsstörungen und Besamung der Haustiere 1, 36.
- Weiss, K. (1952): *Wien. tierärztl. Mschr.* 39, 668.